



⑯ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑯ ⑫ Offenlegungsschrift  
⑯ ⑩ DE 197 53 849 A 1

⑯ Int. Cl. 6:  
**B 01 L 3/00**

G 01 N 33/48  
G 01 N 33/52  
G 01 N 21/55  
B 01 D 69/00  
// G01N 31/22,33/66

⑯ Anmelder:  
Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑯ Erfinder:  
Zimmer, Volker, 69221 Dossenheim, DE

DE 197 53 849 A 1

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑯ Analytisches Testelement mit sich verjüngendem Kapillarkanal  
⑯ Die Erfindung betrifft ein analytisches Testelement zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, enthaltend ein Nachweiselement und einen zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal, der eine Probenaufgabeöffnung an einem Ende des zum kapillaren Flüssigkeitstransports befähigten Kanals besitzt, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigte Kanal von der Probenaufgabeöffnung in Richtung des kapillaren Transports zumindest bis zum Beginn des Nachweiselements stetig verjüngt. Ebenfalls betroffen ist die Verwendung des besagten analytischen Testelements zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit sowie ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer flüssigen Probe mit Hilfe des besagten analytischen Testelements.

DE 197 53 849 A 1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein analytisches Testelement zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, enthaltend ein Nachweiselement und einen zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal, der eine Probenaufgabेऋnung an einem Ende des zum kapillaren Flüssigkeitstransports befähigten Kanals besitzt. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung des besagten analytischen Testelements zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit sowie ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer flüssigen Probe mit Hilfe des besagten analytischen Testelements.

Zur qualitativen oder quantitativen analytischen Bestimmung von Bestandteilen von Körperflüssigkeiten, insbesondere von Blut, werden oft sogenannte trägegebundene Tests verwendet. Bei diesen sind Reagenzien in oder auf entsprechenden Schichten eines festen Trägers enthalten, der mit der Probe in Kontakt gebracht wird. Die Reaktion von flüssiger Probe und Reagenzien führt bei Anwesenheit eines Zielanalyten zu einem nachweisbaren Signal, insbesondere einem Farbumschlag, welcher visuell oder mit Hilfe eines Geräts, meist reflexionsphotometrisch, ausgewertet werden kann.

Testelemente oder Testträger sind häufig als Teststreifen ausgebildet, die im wesentlichen aus einer länglichen Tragschicht aus Kunststoffmaterial und darauf angebrachten Nachweisschichten als Testfeldern bestehen. Es sind jedoch auch Testträger bekannt, die als quadratische oder rechteckige Plättchen gestaltet sind.

Visuell oder reflexionsphotometrisch auszuwertende Testelemente für die klinische Diagnostik sind häufig so aufgebaut, daß die Probenauftragszone und die Detektionszone in einer vertikalen Achse übereinander angeordnet liegen. Diese Konstruktionsweise birgt eine Reihe von Problemen. Wenn der probenbeladene Teststreifen zur Vermessung in ein Gerät, beispielsweise ein Reflexionsphotometer, eingebracht werden muß, kann potentiell infektiöses Probenmaterial mit Geräteteilen in Berührung kommen und diese gegebenenfalls kontaminiieren. Des Weiteren ist, vor allem in den Fällen, in denen die Teststreifen von ungeschulten Personen benutzt werden, beispielsweise bei der Blutzuckerselbstkontrolle von Diabetikern, eine Volumendosierung nur schwer zu realisieren. Zudem benötigen herkömmliche Testelemente aufgrund ihres Aufbaus oftmals verhältnismäßig große Probenvolumina, um zuverlässige Messungen zu ermöglichen. Je mehr Probenvolumen benötigt wird, um so schmerzhafter kann dies für den Patienten, dessen Blut untersucht werden soll, sein. Es wird deshalb generell angestrebt, Teststreifen zur Verfügung zu stellen, die mit möglichst wenig Probenmaterial auskommen.

Aus DE-A 31 51 291 ist ein Gerät zur Analyse von biologischen Fluiden bekannt, das einen Träger mit einem selbstfüllbaren Meßkanal sowie eine Laminatanordnung mit einer Filterschicht und einer Reagenzialschicht aufweist. Die Probenflüssigkeit wird bei diesem Testträger durch Kapillarkräfte in den Meßkanal transportiert und dringt von diesem in das darüberliegende Laminat ein, wo nach Erwärmen des analytischen Geräts eine Nachweireaktion des Zielanalyten stattfindet. Nachteilig daran ist, daß zum Erzielen eines Meßergebnisses das analytische Gerät mit der darin enthaltenen Probe erwärmt werden muß. Dadurch ist die Benutzung des analytischen Gerätes im wesentlichen auf Labors beschränkt.

In DE-A 195 23 049 wird ein mehrschichtiges Analysenelement beschrieben, bei dem nebeneinander angeordnet eine Probenauftragszone und eine Detektionszone enthalten sind. Das mehrschichtige Analysenelement besteht im we-

sentlichen aus einem stapelartigen Verbund aus einem Vlies und einer porösen Membran, die sich in einem flächigen Flüssigkeitsübergang ermöglichen Kontakt befinden, wobei die Membran in der Probenauftragszone so behandelt ist, daß sie dort keine Flüssigkeit aufnimmt oder transportiert. Das mehrschichtige Analysenelement aus DE-A 195 23 049 kann in einem Teststreifen Verwendung finden, der einen Kapillarspalt enthält, durch den Probenflüssigkeit mit der Probenauftragszone kontaktiert werden kann.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, die Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen. Insbesondere sollte ein einfach zu handhabendes, zuverlässig selbständig volumendosierendes Testelement zu Verfügung gestellt werden, mit dem unter Verwendung minimaler Probenvolumina eine räumliche Trennung von Detektionszone und Probenaufgabestelle möglich ist. Zusätzlich sollte der Probentransport von der Probenaufgabe zum Detektionsbereich so schnell sein, daß die Analyse einer Probe zeitlich dadurch nicht limitiert wird. Des Weiteren sollte durch einen einfachen Aufbau des Testelements eine kostengünstige, produktionstechnisch einfach zu realisierende Fertigung ermöglicht werden.

Dies wird durch den Gegenstand der Erfindung, wie er in den Patentansprüchen charakterisiert ist, erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches Testelement zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, enthaltend ein Nachweiselement und einen zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal, der eine Probenaufgabेऋnung an einem Ende des zum kapillaren Flüssigkeitstransports befähigten Kanals besitzt, dadurch gekennzeichnet, daß sich der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal von der Probenaufgabेऋnung in Richtung des kapillaren Transports zumindest bis zum Beginn des Nachweiselementes stetig verjüngt.

Die Verjüngung des kapillaraktiven Kanals dient dazu, sicherzustellen, daß das Probenvolumen, das sich im kapillaren Kanal befindet, zuverlässig und ohne Abreißen der Probenflüssigkeitssäule vom Nachweiselement aufgesaugt werden kann. Bei einem nicht sich verjüngenden Kanal ist die Gefahr gegeben, daß die Flüssigkeitssäule beim Überführen der Probenflüssigkeit vom Kanalinneren auf das Nachweiselement abreißt, nur ein Teil der Flüssigkeit, die sich im kapillaraktiven Kanal befindet, zum Nachweiselement gelangt und somit eine Unterdosierung des Nachweifeldes resultiert. Dem wird durch die erfundungsgemäße Verjüngung entgegengewirkt. Bevorzugt betrifft die Verjüngung des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals diejenige Dimension des Kanals, die dessen Kapillarität bewirkt. Für Kapillaren mit rechteckigem Querschnitt ist dies in aller Regel die Höhe des Kanals. Die Höhe des Kanals ist dabei diejenige Dimension, die mit der Transportrichtung der Flüssigkeit im Kanal einen rechten Winkel bildet und zudem im wesentlichen senkrecht auf der Ebene des Nachweiselementes steht, die zum Beobachten oder Vermessen offen liegt. Die Breite des Kanals liegt im Gegensatz zur Höhe im wesentlichen parallel zu besagter Ebene des Nachweiselementes. Durch die stetige Verjüngung des Kanals hin zum Nachweiselement wird die Kapillarität ebenfalls stetig erhöht. Tritt nun Probenflüssigkeit vom Kanal in das Nachweiselement über, so bewirkt die höhere Kapillarität im Kanal an der Nachweiselementseite, daß Probenflüssigkeit aus den Bereichen geringerer Kapillarität nachrückt. Auf diese Weise wird ein vollständiges Füllen des Nachweiselements erreicht, was mit einem – im Idealfall vollständigen – Leeren des Kanals einhergeht. In den Kanal muß daher nicht mehr Probe aufgenommen werden, als für das Nachweiselement erforderlich ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Ver-

jüngung des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals linear von der Probenaufgabeöffnung zum Nachweiselement. Jedoch sind auch andere Formen der Verjüngung, beispielsweise eine leicht gekrümmte Variante, denkbar. Anders ausgedrückt bedeutet dies, daß der Querschnitt des kapillaraktiven Kanals an der Probenaufgabeöffnung größer ist als am entgegengesetzten Ende des Kanals, das sich unter dem Nachweiselement befindet.

Es ist besonders bevorzugt, daß der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigte Kanal an dem Ende, das der Probenaufgabeöffnung gegenüberliegt, dadurch beendet ist, daß eine abrupte Erweiterung derjenigen Dimension des Kanals stattfindet, die dessen Kapillarität bewirkt. Eine solche abrupte Erweiterung kann auch als Höhenstufe bezeichnet werden.

Vorzugsweise reicht der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigte Kanal in Richtung des kapillaren Transports von der Probenaufgabeöffnung höchstens bis zu der der Probenaufgabeöffnung zugewandten Grenze der Detektionszone des Nachweiselements.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Dimensionen des kapillaren Kanals so auf das Nachweiselement abgestimmt, daß das maximale Probenvolumen, das der kapillare Kanal aufnehmen kann, etwa der Probenmenge entspricht, die durch das Nachweiselement aufgesaugt werden kann und für eine zuverlässige Analyse notwendig ist. Im Idealfall sind beide Volumina gleich groß und die Probe wird vollständig aus dem Kanal in das Nachweiselement überführt. Dadurch wird zum einen vermieden, daß überschüssige Probe das Nachweiselement erreicht, und zum anderen, daß zu wenig Probe für die Nachweisreaktion vorhanden ist. Da die Nachweisreaktion und die aus ihr resultierenden Signale ab bestimmten, systembedingten Grenzen volumenabhängig sind, führen Unter- oder Überdosierungen zu fehlerhaften Meßergebnissen. Diese werden auf die erfundungsgemäße Weise vermieden. Der kapillare Kanal dient somit einer Volumendosierung durch das Testelement mit dem Ziel, Unter- beziehungsweise Überdosierung des Nachweiselements und damit unzuverlässige oder gar falsche Meßergebnisse zu vermeiden.

Da für den bevorzugten Fall, daß der Kanal einen im wesentlichen rechteckigen Querschnitt aufweist, eine Dimension, beispielsweise die Höhe des Kanals, durch die physikalischen Grenzen der Kapillaraktivität vorgegeben ist, läßt sich das Volumen des kapillaren Kanals durch geeignete Wahl der beiden übrigen Dimensionen, beispielsweise Länge und Breite, einstellen. Die Höhe der Kapillare liegt beispielsweise für Blut in der Größenordnung von 10 bis 500 µm, bevorzugt zwischen 20 und 300 µm, da sonst keine Kapillaraktivität zu beobachten ist. Dies gilt für den sich verjüngenden Kanal sowohl für die Höhe auf der Probenaufgabeseite als auch auf der entgegengesetzten Seite, die dem Nachweiselement zugewandt ist. Je nach gewünschtem Volumen kann die Breite dann mehrere mm, bevorzugt 1 bis 10 mm, und die Länge bis zu einigen cm, bevorzugt 0,5 bis 5 cm, betragen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen analytischen Testelements ist zumindest eine, besser jedoch zwei, ganz besonders bevorzugt zwei sich gegenüberliegende Flächen der die innere Oberfläche des zum kapillaren Flüssigkeitstransports befähigten Kanals bildenden Flächen, hydrophilisiert. Hydrophile Oberflächen sind in diesem Zusammenhang wasseranziehende Flächen. Wäßrige Proben, darunter auch Blut, spreiten auf solchen Oberflächen gut. Solche Flächen sind unter anderem dadurch charakterisiert, daß an der Grenzfläche ein Wassertropfen auf ihnen einen spitzen Rand- oder Kontaktwinkel ausbildet. Im Gegensatz dazu wird auf hydrophoben, das heißt wasserab-

weisenden Oberflächen, an der Grenzfläche zwischen Wassertropfen und Oberfläche ein stumpfer Randwinkel ausgebildet.

Der Randwinkel als Resultat der Oberflächenspannungen der Prüfflüssigkeit und der zu untersuchenden Oberfläche ist als Maß für die Hydrophilie einer Oberfläche geeignet. Wasser hat beispielsweise eine Oberflächenspannung von 72 mN/m. Liegt der Wert der Oberflächenspannung der betrachteten Fläche weit, d. h. mehr als 20 mN/M, unter diesem Wert, so ist die Benetzung schlecht und der resultierende Randwinkel ist stumpf. Eine solche Fläche wird als hydrophob bezeichnet. Nähert sich die Oberflächenspannung dem Wert, der für Wasser gefunden wird, so ist die Benetzung gut und der Randwinkel wird spitz. Wird die Oberflächenspannung dagegen gleich oder größer dem für Wasser gefundenen Wert, so zerläuft der Tropfen und es findet Totalspreitung der Flüssigkeit statt. Ein Randwinkel ist dann nicht mehr zu messen. Flächen, die mit Wassertropfen einen spitzen Randwinkel bilden oder bei denen Totalspreitung eines Wassertropfens beobachtet wird, werden als hydrophil bezeichnet.

Die Bereitschaft einer Kapillare, eine Flüssigkeit aufzusaugen, geht mit der Benetzbarkeit der Kanaloberfläche mit der Flüssigkeit einher. Für wäßrige Proben bedeutet dies, daß eine Kapillare aus einem Material gefertigt werden sollte, dessen Oberflächenspannung nahe an 72 mN/m heranreicht oder diesen Wert übertrifft.

Ausreichend hydrophile Materialien zum Aufbau einer Kapillare, die schnell wäßrige Proben aufsaugt, sind beispielsweise Glas, Metall oder Keramik. Für den Einsatz in Testträgern sind diese Materialien jedoch ungeeignet, da sie einige gravierende Nachteile aufweisen, beispielsweise Bruchgefahr bei Glas oder Keramik, oder Veränderung der Oberflächeneigenschaften mit der Zeit bei zahlreichen Metallen. Üblicherweise werden deshalb zur Fertigung von Testelementen Kunststofffolien oder -formteile eingesetzt. Die verwendeten Kunststoffe übertreffen dabei in der Regel kaum eine Oberflächenspannung von 45 mN/m. Selbst mit den, relativ betrachtet, hydrophilsten Kunststoffen wie beispielsweise Polymethylmethacrylat (PMMA) oder Polyamid (PA) lassen sich – wenn überhaupt – nur sehr langsam saugende Kapillaren aufbauen. Kapillaren aus hydrophoben Kunststoffen wie beispielsweise Polystyrol (PS), Polypropylen (PP) oder Polyethylen (PE) saugen im wesentlichen keine wäßrigen Proben. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, Kunststoffe für die Verwendung als Konstruktionsmaterial für Testelemente mit kapillaraktiven Kanälen hydrophil auszustatten, das heißt zu hydrophilisieren.

Wie bereits oben erwähnt sind in einer bevorzugten Ausführungsform des erfundungsgemäßen analytischen Testelements zumindest eine, besser jedoch zwei, ganz besonders bevorzugt zwei sich gegenüberliegende Flächen der die innere Oberfläche des zum kapillaren Flüssigkeitstransports befähigten Kanals bildenden Flächen hydrophilisiert. Wird mehr als eine Fläche hydrophilisiert, so können die Flächen entweder mit der gleichen oder mit unterschiedlichen Methoden hydrophil gemacht werden. Die Hydrophilierung ist vor allem dann notwendig, wenn die Materialien, die den kapillaraktiven Kanal bilden, insbesondere der Träger, selbst hydrophob oder nur sehr wenig hydrophil sind, beispielsweise weil sie aus unpolaren Kunststoffen bestehen. Unpolare Kunststoffe, wie zum Beispiel Polystyrol (PS), Polyethylen (PE), Polyethylenterephthalat (PET) oder Polyvinylchlorid (PVC), sind von Vorteil als Trägermaterialien, weil sie die zu untersuchenden Flüssigkeiten nicht absorbieren und damit das Probenvolumen effektiv von der Nachweisschicht genutzt werden kann. Durch die Hydrophilierung der Oberfläche des Kapillarkanals wird erreicht, daß

eine polare, bevorzugt wäßrige Probenflüssigkeit bereitwillig in den kapillaren Kanal eintritt und dort rasch zum Nachweiselement bzw. zu der Stelle des Nachweiselements, an der die Detektion stattfindet, transportiert wird.

Idealerweise wird die Hydrophilierung der Oberfläche des kapillaren Kanals dadurch erreicht, daß zu seiner Fertigung ein hydrophiles Material eingesetzt wird, das jedoch die Probenflüssigkeit selbst nicht oder nicht wesentlich aufzusaugen vermag. Wo dies nicht möglich ist, kann die Hydrophilierung einer hydrophoben oder nur sehr wenig hydrophilen Oberfläche durch geeignete Beschichtung mit einer stabilen, gegenüber dem Probenmaterial inerten, hydrophilen Schicht erreicht werden, beispielsweise durch kovalente Bindung von photoreaktiv ausgerüsteten, hydrophilen Polymeren auf eine Kunststoffoberfläche, durch Aufbringen netzmittelhaltiger Schichten oder durch Beschichtung von Oberflächen mit Nanokompositen mittels Sol-Gel-Technologie. Darüberhinaus ist es möglich, durch thermische, physikalische oder chemische Behandlung der Oberfläche eine gesteigerte Hydrophilie zu erzielen.

Ganz besonders bevorzugt wird die Hydrophilierung durch die Verwendung von dünnen Schichten oxidierten Aluminiums erreicht. Diese Schichten werden entweder direkt auf die gewünschten Bauteile des Testelements aufgebracht, beispielsweise durch Vakuumbedampfen der Werkstücke mit metallischem Aluminium und anschließende Oxidation des Metalls, oder in Form von Metallfolien oder metallbeschichteten Kunststofffolien für den Testträgeraufbau verwendet, die ebenfalls zur Erzielung der erwünschten Hydrophilie oxidiert werden müssen. Metallschichtdicken von 1 bis 500 nm sind dabei ausreichend. Die Metallschicht wird anschließend zu Bildung der oxidierten Form oxidiert, wobei sich neben der elektrochemischen, anodischen Oxidation vor allem die Oxidation in Gegenwart von Wasserdampf oder durch Kochen in Wasser als besonders geeignete Methoden herausgestellt haben. Die so erzielten Oxidschichten sind je nach Methode zwischen 0,1 und 500 nm, bevorzugt zwischen 10 und 100 nm dick. Größere Schichtdicken sowohl der Metallschicht als auch der Oxidschicht sind zwar prinzipiell praktisch realisierbar, zeigen aber keine weiteren vorteilhaften Wirkungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das Nachweiselement des erfundungsgemäßen analytischen Testelements alle für die Nachweisreaktion des Zielanalyten in der Probe notwendigen Reagenzien und gegebenenfalls Hilfsstoffe. Es können jedoch auch nur Teile der benötigten Reagenzien und Hilfsstoffe enthalten sein. Dem mit der Technik von analytischen Testelementen oder diagnostischen Testträgern vertrauten Fachmann sind solche Reagenzien und Hilfsmittel bestens bekannt. Für Analyten, die enzymatisch nachzuweisen sind, können beispielsweise Enzyme, Enzymsubstrate, Indikatoren, Puffersalze, inerte Füllstoffe und dergleichen mehr im Nachweiselement enthalten sein.

Das Nachweiselement des erfundungsgemäßen Testelements ist vorzugsweise aus mehreren Schichten aufgebaut und kann gegebenenfalls einen inertnen Träger, bevorzugt auf der Seite des Nachweiselements, die nicht mit der Probe in Kontakt gebracht wird, enthalten. Für den besonders bevorzugten Fall, daß die Nachweisreaktion zu einer beobachtbaren Farbveränderung führt, worunter in diesem Zusammenhang entweder die Änderung einer Farbe, das Entstehen einer Farbe oder das Verschwinden von Farbe verstanden werden soll, ist sicherzustellen, daß der Träger durch geeignete Maßnahmen eine visuelle oder optische Beobachtung der Nachweisreaktion zuläßt. Dazu kann das Trägermaterial des Nachweiselements selbst durchsichtig sein, beispielsweise eine durchsichtige Kunststofffolie, wie beispielsweise Polycarbonatfolie, oder auf der Detektionsseite eine durchsich-

tige Aussparung besitzen. Neben Nachweisreaktionen, die zu Farbveränderungen führen, sind dem Fachmann auch andere Nachweisprinzipien bekannt, die mit dem beschriebenen Testelement realisiert werden können, beispielsweise elektrochemische Sensoren.

Für das Nachweiselement ist es erforderlich, solche Materialien einzusetzen, die in der Lage sind, die zu untersuchende Flüssigkeit mit darin enthaltenen Inhaltsstoffen aufzunehmen. Dies sind sogenannte saugfähige Materialien, wie beispielsweise Vliese, Gewebe, Gewirke oder poröse Kunststoffmaterialien, die als Schichtmaterialien verwendet werden können. Die dafür in Frage kommenden Materialien müssen Reagenzien tragen können, die für den Nachweis des zu bestimmenden Analyts erforderlich sind.

Bevorzugte Materialien für das Nachweiselement sind Vliese, Papiere oder poröse Kunststoffmaterialien, wie Membranen. Als poröse Membranmaterialien sind Polyamid-, Polyvinylidendifluorid-, Polyethersulfon- oder Polysulfonmembranen ganz besonders bevorzugt. Die Reagenzien zur Bestimmung des nachzuweisenden Analyts sind in der Regel durch Imprägnierung in die vorstehend genannten Materialien eingebracht worden.

Besonders bevorzugt als Nachweiselement ist ein mehrschichtiger, stapelartiger Materialverbund enthaltend neben einander angeordnet eine Probenauftragszone und eine Detektionszone, wobei die Detektionszone ein Reagenz enthält, das mit dem zu bestimmenden Analyt oder einer hiervon abgeleiteten Substanz ein detektierbares Signal bildet. Die Probenauftrags- und Detektionszone sind auf einem stapelartigen Verbund aus einem Vlies und einer porösen Membran so angeordnet, daß sie sich in einem einen flächigen Flüssigkeitsübergang ermöglichen direkten oder indirekten Kontakt befinden. Die Membran ist so gewählt, daß sie Flüssigkeit horizontal, das heißt in der Fläche, deutlich langsamer transportiert als das Vlies. Im Bereich der Probenauftragszone, die sich bis zur Detektionszone des mehrschichtigen Analyselements erstreckt, ist die Membran so behandelt, daß sie Flüssigkeit weder aufnimmt noch transportiert. Dadurch wird gewährleistet, daß zunächst die Probe vollständig von der Probenauftragszone auf das Vlies durchtränkt kann und anschließend erst in die Membran eindringt. Solche Nachweiselemente sind aus DE-A 195 23 049 bekannt. Die dort beschriebenen Nachweiselemente werden ganz besonders bevorzugt für das erfundungsgemäße Testelement eingesetzt. Selbstverständlich kann die Detektionszone des Nachweiselements auch aus mehreren diskreten Zonen bestehen, die für den Nachweis unterschiedlicher Zielanalyten aus einer Probenflüssigkeit geeignet sind.

Nachweiselemente, wie sie in DE-A 195 23 049 beschrieben sind, verfügen über Bestandteile, die einen Ausschluß störender Probenanteile von der Nachweisreaktion erlauben und somit als Filter, beispielsweise für partikuläre Probennbestandteile wie Blutzellen, wirken. Für visuelle oder optische Detektionsverfahren ist beispielsweise bei der Analyse von Blutproben der rote Blutfarbstoff Hämoglobin, der in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) enthalten ist, störend. Zweckmäßigerweise werden diese störenden Komponenten vor der eigentlichen Detektionsreaktion von der Probe, beispielsweise Vollblut, abgetrennt. Dies kann durch Probenaufbereitung vor dem Applizieren der Probe auf das Testelement geschehen, wie zum Beispiel durch Zentrifugieren von Vollblut und anschließender Serum- oder Plasmagewinnung. Bequemer und auch für den Laien einfacher ist es, wenn das Testelement diesen Trennungsschritt durch geeignete Konstruktion selbst durchführt. Dem Fachmann sind Mittel aus der Teststreifentechnologie bekannt, die einen zuverlässigen Ausschluß von Erythrozyten gewährleisten. Beispielsweise seien genannt die Verwendung von se-

mipermeablen Membranen oder Glasfaservliesen, wie sie beispielsweise aus EP-B-0 045 476 bekannt sind, zur Abtrennung roter Blutkörperchen.

Neben den bereits genannten Vorteilen des erfindungsgemäßen Testelements weist es weitere Vorteile auf. Durch die räumliche Trennung von Probenaufgabeort und Signaldetektion in Verbindung mit der Probenvolumendosierung wird eine hygienische Handhabung des Probenmaterials erreicht. Vor allem bei optischer Detektion, beispielsweise mit Hilfe eines Reflexionsphotometers, wird eine Kontamination des Gerätes weitestgehend ausgeschlossen, da die Probe beispielsweise auf ein aus dem Gerät herausragendes Testelement aufgegeben werden kann, dabei vollständig in den kapillaren Kanal eingesaugt wird und selbständig ohne weitere Maßnahmen zu der im Geräteinneren gelegenen Detektionszone des Testelements transportiert wird. Das vollständige Aufsaugen des Probenmaterials durch die kapillaraktive Zone im Testelement verhindert zudem, daß überschüssige Probe an der Testelementaußenseite verbleibt, so daß auch diese Eigenschaft zur Hygiene beiträgt.

Des Weiteren benötigt das erfindungsgemäße Testelement in einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform bedeutend weniger Probenmaterial als herkömmliche Testelemente. Während letztere oftmals über 12 µl Probenflüssigkeit benötigen, wird das erforderliche Probenmindestvolumen bei dem erfindungsgemäßen Testelement auf deutlich unter 10 µl, bevorzugt unter 5 µl, besonders bevorzugt auf 3 bis 4 µl Probe gesenkt. Dies wird durch die Optimierung des Probenflusses genau an den Bestimmungsort, sowie durch die Tatsache, daß das Probenvolumen weitgehend quantitativ aus dem Kanal in das Nachweiselement überführt werden kann, was wiederum auf dessen sich verjüngenden Querschnitt zurückzuführen ist, erreicht. Insbesondere für den Fall, daß die Probe Blut ist, kann dadurch für die zu untersuchende Person die Probengewinnung einfacher und vor allem mit weniger Schmerz verbunden sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen analytischen Testelements zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit.

Außerdem ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer flüssigen Probe, insbesondere einer Körperflüssigkeit wie Blut, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Schweiß etc., mit Hilfe eines erfindungsgemäßen analytischen Testelements. Dabei wird zunächst die flüssige Probe an der Probenaufgabeöffnung mit dem Testelement kontaktiert. Durch Kapillarkräfte in den zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal wird die Probenflüssigkeit bis zu dessen vollständiger Füllung transportiert. Die Probe benetzt dabei das Nachweiselement auf der dem Kanal zugewandten Oberfläche und dringt in dieses ein. Gegebenenfalls geht die Probe mit den im Nachweiselement enthaltenen Reagenzien eine analytische Reaktion ein, so daß auf die Anwesenheit und gegebenenfalls die Menge des zu bestimmenden Analyten rückgeschlossen werden kann.

Die Erfindung wird durch die Fig. 1 und 2 und die nachfolgenden Beispiele näher erläutert.

Fig. 1 zeigt einen Längsschnitt durch eine besonders bevorzugte Ausführungsform des mehrschichtigen Nachweiselements.

Fig. 2 zeigt einen Längsschnitt durch eine besonders bevorzugte Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Testelements.

Die Ziffern in den Figuren bedeuten:

## Bezugszeichenliste

- 1 Vlies
- 2 Membran
- 3 Probenauftragszone
- 4 Detektionszone
- 5 flüssigkeitsundurchlässiger Bereich
- 6 reagenzienhaltige Zone 1
- 7 reagenzienhaltige Zone 2
- 8 reagenzienhaltige Zone 3
- 9 mehrschichtiges Nachweiselement
- 10 Abdeckung
- 11 Bodenteil
- 12 Probenaufgabeöffnung
- 13 Entlüftungsöffnung
- 14 kapillaraktiver Bereich
- 15 Höhenstufe

In Fig. 1 ist ein mehrschichtiges Nachweiselement (9) aus Vlies (1) und Membran (2) für den Parallelnachweis von drei Analyten dargestellt. Die Probenauftragszone (3) erstreckt sich über den Bereich, der durch den flüssigkeitsundurchlässigen Bereich (5) der Membran (2) definiert ist. Flüssigkeit, die in der Probenauftragszone (3) auf das Vlies aufgebracht wird, wird so auf jeden Fall durch den flüssigkeitsundurchlässigen Bereich (5) daran gehindert, dort in die Membran (2) einzudringen. Ein Übertritt von Flüssigkeit aus dem Vlies (1) in die Membran (2) ist nur innerhalb der Detektionszone (4) möglich. Durch geschickte Materialauswahl ist zu erreichen, daß sich auf das Vlies (1) in der Probenauftragszone (3) aufgegebene Flüssigkeit schnell innerhalb des Vlieses (1) verteilt und von dort quer zur Ausbreitungsrichtung in der Vliesfläche in die Detektionszone (4) der Membran (2) gelangt und dort in die Reagenzien enthaltenden Bereiche (6, 7, 8) eintritt. Bei Anwesenheit der jeweiligen Analyten findet dort eine Signalbildung statt, die von der Membranseite her visuell oder apparativ beobachtet werden kann.

In Fig. 2 ist eine besonders bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Testelements schematisch dargestellt. Das Testelement besteht aus einem in Spritzgußtechnik gefertigten Bodenteil (11) und einer ebenfalls spritzgegossenen Abdeckung (10), in die das Nachweiselement (9) integriert ist. Die Spritzgußteile (10 und 11) können miteinander verklebt, verschweißt oder verklebt sein. Gestalt und Größe des kapillaren Kanals (14) werden durch die Komponenten Bodenteil (11), Abdeckung (10) und Nachweiselement (9) bestimmt. Insbesondere bestimmt das Bodenteil (11) die stetige Verjüngung und mit der Höhe (15) die Länge des kapillaraktiven Kanals (14). Die Verjüngung kann alternativ aber auch von der Abdeckung (10) oder von beiden bestimmt werden.

An der gegenüberliegenden Seite des kapillaren Kanals (14) befindet sich eine Entlüftungsöffnung (13), die das Entweichen von Luft bei der Befüllung des Kapillarkanals (14) mit Probenflüssigkeit erlaubt.

Die Kapillarzone (14) reicht von der Probenaufgabeöffnung (12) maximal bis zum Beginn der Detektionszone des mehrschichtigen Nachweiselementes (9). Probenaufgabeöffnung (12) und Höhe (15) begrenzen den kapillaraktiven Bereich (3) in Richtung des kapillaren Transports.

Bei der Verwendung des gezeigten Testelements wird das Testelement mit der Probenaufgabeöffnung (12) beispielsweise an einen sich an der Fingerkuppe befindlichen Blutstropfen gebracht. Dabei kommt der Blutstropfen mit dem kapillaren Kanal (14) in Kontakt. Letzterer füllt sich solange mit Probe, bis er von der Probenaufgabeöffnung (12) bis zur Höhe (15) gefüllt ist. Danach wird der Testträger vom

Patientenfinger entfernt, wodurch gewährleistet ist, daß lediglich die sich im Kapillarkanal (14) befindliche Probe für das Nachweiselement (9) verfügbar ist. Eine Überdosierung wird damit ausgeschlossen.

5

### Beispiel 1

#### Herstellung des erfundungsgemäßen analytischen Testelements

10

Das Bodenteil (11), in das eine Vertiefung eingearbeitet ist, die den sich verjüngenden kapillaren Kanal ergeben soll, und die Abdeckung (10), die eine Aussparung für das Nachweiselement enthält, werden mittels Spritzgußverfahren aus Polymethylmethacrylat (PMMA) hergestellt. Diejenigen Flächen der Spritzgußteile, die mit Probenflüssigkeit in Berührung kommen können, werden anschließend in einem Vakuumbedämpfer mit einer Schicht Aluminium einer Schichtdicke von ca. 30 nm bedampft. Daraufhin werden die Aluminiumschichten durch Behandlung mit heißem Wasserdampf oxidiert.

15

In die fertig beschichtete Abdeckung (10) wird ein an die Größe der Aussparung angepaßtes Nachweiselement (9), das gemäß DE-A 195 23 049 hergestellt wurde, in richtiger Orientierung eingelegt. Abschließend werden die Abdeckung (10), die das Nachweiselement (9) enthält, und das Bodenteil (11) zusammengeklebt.

25

### Beispiel 2

#### Messung der Blutglukosekonzentration mit Hilfe des Testelements aus Beispiel 1

30

Das Testelement aus Beispiel 1 wird mit der Probenaufgabeseite auf einen Probenflüssigkeitstropfen aufgesetzt. Die Kapillare des Testelements füllt sich innerhalb von 2 s selbstständig mit Probe. Ist Glucose in der Probe vorhanden wird nach wenigen Sekunden eine Farbentwicklung im Nachweisfilm sichtbar. Nach ca. 30 bis 35 s ist der Endpunkt der Reaktion erreicht. Die erhaltene Farbe kann mit der Glukosekonzentration der Probe korreliert werden und wird entweder visuell oder reflexionsfotometrisch ausgewertet.

35

### Patentansprüche

45

1. Analytisches Testelement zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit, enthaltend ein Nachweiselement (9) und einen zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal (14), der eine Probenaufgabeförmung (12) an einem Ende des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals (14) besitzt, **durch gekennzeichnet**, daß sich der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigte Kanal (14) von der Probenaufgabeförmung (12) in Richtung des kapillaren Transports zumindest bis zum Beginn des Nachweiselements (9) stetig verjüngt.

50

2. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verjüngung des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals linear erfolgt.

60

3. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Verjüngung des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals diejenige Dimension des Kanals betrifft, die dessen Kapillarität bewirkt.

65

4. Analytisches Testelement gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigte Kanal an dem

Ende, das der Probenaufgabeförmung gegenüberliegt, dadurch beendet ist, daß eine abrupte Erweiterung derjenigen Dimension des Kanals stattfindet, die dessen Kapillarität bewirkt.

5. Analytisches Testelement gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß zumindest eine die innere Oberfläche des zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanals bildenden Flächen hydrophilisiert ist.

6. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Hydrophilierung durch die Verwendung eines hydrophilen Materials oder durch Beschichtung eines wenig hydrophilen Materials mit einer hydrophilen Schicht erreicht wird.

7. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zur Hydrophilierung eine Schicht aus oxidiertem Aluminium verwendet wird.

8. Analytisches Testelement gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Nachweiselement (9) ein mehrschichtiges Nachweiselement (9) mit nebeneinander angeordneter Probenauftragszone (3) und Detektionszone (4) ist, wobei das Nachweiselement (9) im Testelement so ausgerichtet ist, daß nur die Probenauftragszone (3) in Flüssigkeitsübergang ermöglichen Kontakt mit dem zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal (14) steht.

9. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das mehrschichtige Nachweiselement in einer oder mehreren Schichten alle für die Nachweisreaktion des Zielanalyten in der Probe notwendigen Reagenzien sowie gegebenenfalls Hilfsstoffe enthält.

10. Analytisches Testelement gemäß einem der Ansprüche 8 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das mehrschichtige Nachweiselement Mittel enthält, die als Filter für partikuläre Probenbestandteile wirken.

11. Analytisches Testelement gemäß einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß für das mehrschichtige Nachweiselement ein Vlies und eine direkt oder indirekt damit in Kontakt stehende, poröse Membran, welche Flüssigkeit horizontal deutlich langsamer transportiert als das Vlies, in einem stapelartigen Verbund so angeordnet sind, daß ein flächiger Flüssigkeitsübergang möglich ist.

12. Analytisches Testelement gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Membran in der Probenauftragszone so behandelt ist, daß sie keine Flüssigkeit aufnimmt.

13. Verwendung eines analytischen Testelements gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 zur Bestimmung eines Analyten in einer Flüssigkeit.

14. Verfahren zur Bestimmung eines Analyten in einer flüssigen Probe mit Hilfe eines analytischen Testelements gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die flüssige Probe an der Probenaufgabeförmung mit dem Testelement kontaktiert wird und durch Kapillarkräfte in den zum kapillaren Flüssigkeitstransport befähigten Kanal transportiert wird, die Probe dabei das Nachweiselement im Bereich der Probenauftragszone auf der dem Kanal zugewandten Oberfläche benetzt und in dieses eindringt und gegebenenfalls mit den im Nachweiselement enthaltenen Reagenzien eine analytische visuell oder apparativ-optisch, bevorzugt reflexionsphotometrisch beobachtbare Nachweisreaktion eintritt, so daß auf die Anwesenheit und gegebenenfalls die Menge des zu bestimmenden Analyten rückgeht.

**BEST AVAILABLE COPY**

DE 197 53 849 A 1

11

12

schlossen werden kann.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

# BEST AVAILABLE COPY

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:  
Int. Cl. 6:  
Offenlegungstag:

DE 197 53 849 A1  
B 01 L 3/00  
10. Juni 1999

FIG. 1

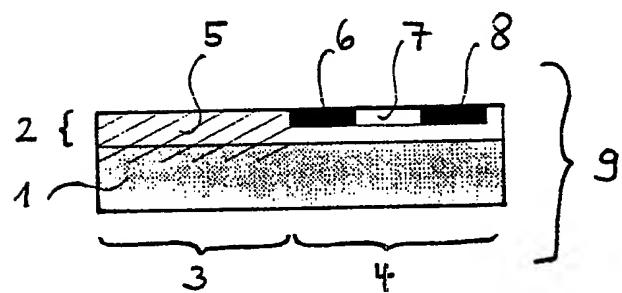


FIG. 2

